

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002201068

WPI Acc No: 1979-01089B/197901

Coenzyme-Q purificn. using porous synthetic resin - giving improved sepn.

and selectivity and avoiding use of toxic solvents

Patent Assignee: NISSHIN FLOUR MILLING CO (NISS )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 53133687	A	19781121				197901 B
JP 85009796	B	19850313				198514
JP 60075294	B	19850427				198523

Priority Applications (No Type Date): JP 7745176 A 19770421; JP 8449302  
A

19760204

Abstract (Basic): JP 53133687 A

The process comprises (i) treating the reduced form of coenzyme Q

(precursor) with a porous synthetic resin, (ii) oxidising the treated

coenzyme Q (air oxidn. or oxidn. with PbO<sub>2</sub>), and then treating the oxidised coenzyme Q with the porous synthetic resin.

When the porous synthetic resin is non-polar, the coenzyme Q is eluted with a polar solvent, and when the resin is polar, the coenzyme

Q is eluted with a non-polar solvent.

The pref. dia. of resin pore is >3 times the size of the molecule

to be treated, usually >50 angstroms. Examples of the resins are non-polar synthetic resins such as styrene-divinylbenzene copolymer and

polar synthetic resins such as polyacryl esters.

The process gives improved separation and selectivity. There is no

loss of the coenzyme during purificn., and recovery of the coenzyme is

high. The resin may be used repeatedly.

Title Terms: COENZYME-Q; PURIFICATION; POROUS; SYNTHETIC; RESIN; IMPROVE;

SEPARATE; SELECT; AVOID; TOXIC; SOLVENT

Derwent Class: A97; B05

International Patent Class (Additional): C12D-005/00; C12D-013/00; C12P-007/66

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-M; A12-W11B; B04-B02C1

Plasdoc Codes (KS): 0231 2653 2705 2733 0306 1123 2020 0203 0486 0493  
2000

2012

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 011 034 04- 055 056 128 231 27& 473 575 595 623 624 642 721

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* V800 G100 M531 L951 H541 H542 H721 H711 H722 H723 M240 M232 M233  
M331 M333 N050 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2) :

\*02\* K0 H5 H7 M282 M210 M211 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225  
M226

M231 M232 M240 M270 M311 M315 M316 M320 G100 M531 L951 H541 H542  
H721 H711 H722 H723 N050 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902

\*03\* G000 G001 G010 G011 G012 G013 G014 G015 G016 G017 G018 G019 G100  
H5

H541 H542 H7 H711 H713 H714 H715 H716 H721 H722 H723 K0 L951

M210

M211 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232 M240  
M270 M282 M311 M315 M316 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M720 M903  
N050 N160

?

⑨日本国特許庁  
公開特許公報

⑩特許出願公開  
昭53-133687 A

⑪Int. Cl.<sup>2</sup>  
C 12 D 5/00  
C 12 D 13/00

識別記号  
112

⑫日本分類  
36(2) D 32

厅内整理番号  
7110-49

⑬公開 昭和53年(1978)11月21日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭補酵素Qの精製方法

⑮特 務 昭52-45176

⑯出 願 昭52(1977)4月21日

⑰發 明 者 鈴木隆夫

東京都練馬区旭町2-21-6

⑱發 明 者 福島英夫

埼玉県入間郡越ヶ島町大字上新田204の2

⑲出 願 人 日清製粉株式会社

東京都中央区日本橋小堀町19-12

明細書

1. 発明の名称 補酵素Qの精製方法

2. 特許請求の範囲

- 1) 遺伝型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理し、次いで過酸化水素で脱色してから再び多孔性合成樹脂で処理することを特徴とする補酵素Qの精製法。
- 2) 多孔性合成樹脂が非極性多孔性合成樹脂である場合極性溶媒を使用してなる前記第1項記載の方法。
- 3) 多孔性合成樹脂が極性多孔性合成樹脂である場合非極性溶媒を使用してなる前記第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は多孔性合成樹脂を用いて合成、発酵あるいは天然物から得られる補酵素Qを精製するに係し、まずその前駆物質である遺伝型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理し、次いで過酸化水素で脱色してから再び多孔性合成樹脂で処理することを特徴とする新規な精製

方法に関する。

補酵素Qは生体内では電子伝達系に関与し、各種疾患に対して矮れた薬理効果を示す物質である。精製の補酵素Qは合成、发酵あるいは天然物より得られるが、高純度の補酵素Qに精製することは、それ自身が非常に不安定な化合物である上に、各々細胞した夾雜物を含むために確めて困難であった。従来、補酵素Qの精製方法としてはシリカゲル、アルミナ、フロリカルなどの無機物を用いたクロマトグラフィーが知られている。この無機吸着剤を用いたクロマトグラフィーは細胞した夾雜物を含む目的物に対しては効果の大きい精製手段ではあるが、工業的には無機吸着剤は比表面が大きいために操作上困難な点が多く、また反復使用の点でも問題がある。またポリエチレン樹脂を吸着剤とする方法も知られていたが、それらは吸着率が小さく工業的精製手段とはなり得なかつた。

本発明者は酶学的に実現し得る精製方法につき種々検討した結果、本発明を完成するに至

つたものである。

すなわち本発明は還元型補酵素を多孔性合成樹脂を用いて処理し、ないで処理した還元型補酵素を酸化後再び多孔性合成樹脂を用いて処理する補酵素の精製方法である。

本発明方法により分離精製ができる物質としては、補酵素の前駆物質である還元型補酵素および補酵素の他に、ビタミンE、およびビタミンE<sub>2</sub>が挙げられる。

本発明方法に使用する多孔性合成樹脂としては、樹脂の単位表面積が大きいほど好適であるが、通常100m<sup>2</sup>/g以上、好ましくは400m<sup>2</sup>/g以上のものである。多孔性合成樹脂の孔径は処理する化合物の分子の大きさの約3倍以上、通常50Å以上が好適であり、且つ平均孔径が大きいほど好ましい結果が得られる。

本発明に用いられる多孔性合成樹脂としては例えはステレン-αビニルベンゼン共重合体〔アンバーライト XAD-2(ローム・アンド・ハース社製)、アンバーライト XAD-4(ロー

- 3 -

孔性合成樹脂によるクロマトグラフィーを行つて精製するのが一般的である。次に、得られた精製補酵素のうち還元以上の融点を有するものは一般的な精製手段である結晶化。例えはアセトン中で結晶化して、結晶物にすることができる。又、本発明に係る還元型補酵素としては、補酵素の還元物であるハイドロキノン体の外、ハイドロキノン様の水溶基がアセチル化されたハイドロキノン・モノエステル、ハイドロキノン・ジ・エステル等が挙げられる。

還元型補酵素が補酵素モノ・エステルあるいはジ・エステルの場合は、補酵素の单なる還元物の場合と同様に多孔性合成樹脂でクロマトグラフィーを行い、次いでケン化した還元化工程に行せばよい。

本発明において使用される展出・抽出溶媒としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、ローブロバノール、アセトン、メチルエチルケトン、イソプロピルエーテル、サトラヒドロフラン、ジオキサン、メチルセロソルブ、

ム・アンド・ハース社製)、ハイポーラスポリマー(三澤化成工業株式会社製)のよう非極性合成樹脂、ポリアクリルエスチル(アンバーライト XAD-7(ローム・アンド・ハース社製)、アンバーライト XAD-8(ローム・アンド・ハース社製))、スルホキシド(アンバーライト XAD-9(ローム・アンド・ハース社製))、アミド(Amido)(アンバーライト XAD-11(ローム・アンド・ハース社製))のよう水極性合成樹脂が挙げられる。

本発明方法をさらに詳しく説明すると合成、処理および天然物から抽出したものとそのままあるいは必要に応じて一般的な還元剤例えば、ハイドロアルファイトソーダ、水素化鋼塩ナトリウム等を添加して常法により還元型補酵素とさせてから、前記多孔性合成樹脂を通常の溶媒によるクロマトグラフィーの固体として施用し、抽出液中の還元型補酵素を区分を設ける。次に得られた還元型補酵素を常法の精製を酸化剤で処理して補酵素にもしたものと併び前記多

- 4 -

酢酸エチル、ベンゼン、トルエン、ヘキサン、石油エーテル、石油ベンゼン、イソペンタン、四塩化炭素、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、水等の工業的に安価な既存または新規性の溶媒を单独あるいは種々割合に混合した混合溶媒として使用することができます。溶媒を使用するに際し例えはステレン・ジビニルベンゼン共重合体のような非極性多孔性合成樹脂に対してもメタノールのようを極性溶媒を用いて比較的非極性の交錯体を形成させ、次にメタノールにアセトンを加えて、複数を弱めた混合溶媒で展開し、目的物質を溶出させる。またアクリル酸エスチル混合体のような極性多孔性合成樹脂に対しても逆にヘキサンのようを非極性溶媒により展開溶出させる。溶出操作が終了した樹脂は不溶物が全く吸着しない溶媒で洗浄すれば再利用が可能である。洗浄溶媒はアセトン、イソプロピルエーテル、ベンゼン等の比較的非極性有機溶媒が効果的である。

本発明において特に好ましい方法としては還

- 5 -

- 5 -

元溶液器又はより精製器のいずれの場合でも多孔性合成樹脂として非活性合成樹脂を用い、溶出液として水、アルコール類、ケトン類、ジメチルスルホキシド、H,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリルなどの極性溶媒を使用して抽出する方法が好適である。この場合使用される極性溶媒としては一般には炭溶剤1~5のアルコール類、炭溶剤3~6のケトン類を基本とする混合溶媒、例えばメタノールと水、メタノールとアセトン、メタノールと2-ヘキサン、アセトンと水などの組合せが工業的に有効である。またその他の種々の組合せ、又は单一溶媒の使用が可能ることは勿論である。

本発明方法は一般に次の順序によつて実験される。

首先是此より以上のカラムに水を満たし、自然沈降によつて目的物の溶出液(留置)以上上の多孔性合成樹脂を充填する。次に精製目的物質が溶出しない溶媒でカラムを置換したのち目的物をカラムの上部から吸引させる。カラム

- 7 -

汎性に加えて、本発明方法ではさらに還元型樹脂器と精製器との性質の差を利用し各々の化合物の処理において類似する構造を有する夾杂物を分離することができるので高純度の精製器を得ることができる。また本発明方法に使用される多孔性合成樹脂は無機吸着剤、イオン交換樹脂などと異なり化学的に不活性であることから、抽出力の大きい溶剤例えばアセトンなどにより吸着物を溶出させることにより容易にしかも完全に元の状態に再生されるので工業的につきわんで有利である。

本発明は従来法と比較しぬれども著しく優れた効果を有するものである。即ち分離選択性が極めて大きいこと、また多孔性合成樹脂に対する夾杂物の吸着量が極めて大きく、かつ無機吸着剤と異なり、吸着点がないため分解が恐らず、多孔性合成樹脂処理操作中における損失が全くなく、回収率が著しく高いこと、多孔性合成樹脂を繰り返し使用することができること、無機物の吸着剤と炭化水素類、エーテル類など

トグラフィーは一般の方法と同様に行うが、目的物の溶出が析出する場合は必要に応じてカラムを加温してもよい。流出液は区分して採取し目的物質を含む溶出区分を識別すれば目的物質が得られる。次にアセトン、ベンゼン、エーテル、エスチル系などの溶出力の大きい溶剤によりカラムを洗浄し、吸着物質を除き、溶剤でカラムを置換することにより再び精製クロマトグラフィーを実施することができる。

精製器のようないソブレン骨格を有する化合物は、多孔性合成樹脂との間に適度の親和力が生じるため選択性に類似構造を有する夾杂物を容易に分離することができる。精製器等の化合物と多孔性合成樹脂との親和力はイソブレン類のみ由来するものではなく、分子を構成している置換基の極性、立体構造等によつても左右される。従つて、多孔性合成樹脂を使用することにより、従来の炭溶剤による精製方法即ち脱脂剤と分子の活性点同士による吸着、脱離の方式による精製では得られなかつた大きさを過

- 8 -

の脱水性溶媒を用いる従来方法と異なり、燃電気等による火災の危険性の少ないより安全な所蔵の選択が可能となつたこと等機械化および通用性共に満足し得るものである。

次に本発明の実施例を示すがこれらは精製法の一例であつてこれに限定されるものではない。  
実施例 1

ハイポーラスボリマー FP-20(比表面積718.0m<sup>2</sup>/g、細孔容積1.077ml/g、40ノンシュー、三塗化成工業株式会社製)200gをカラム(Φ4.5cm×300mm)に充填し、アセトン：メタノール(5:7)混合液にて逆流した後静置する。これにイソデカブレノールと2,5-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノンとを三塗化ホウ素・エーテル錯体試験の存在下で結合して得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレノルハイドロキノン(還元型樹脂留出物)を含む油酸(留出物30g(留出48%)を脱脂器合算30mlで攪拌乳漬させて充填カラム中を運動させる。次いで同一混合液で洗出させ

- 6 -

-477-

- 10 -

る。抽出液は約100mLを区分し、それぞれの区分液の懸濁小量についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行つて2,5-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンハイドロキノンを含む区分を検出し、溶媒を減圧濃縮によつて留去する。得られた処理物をイソプロピルエーテル400mLに溶解させ、5%水酸化カリウム水20mLを加え、室温で攪拌下に30分間空気を導入して炭化する。次いでイソプロピルエーテル層を水洗し、溶媒を乾燥してから減圧留去すると粗酵素Q<sub>10</sub>を含む赤色油状物が得られる。

次に先に使用したと同じハイポーラスボリマーHP-20を充填したカラムをアセトンで洗浄し、アセトン洗液を除去した後、アセトン：メタノール(1:1)の混合溶剤で逆洗し、静置する。次にカラムを35°Cに保温してから前記赤色油状物をアセトン20mLに乳化させて充填カラム中を流動させる。同溶媒で展開分離されたのち薄層クロマトグラフィーを行つて、粗酵素Q<sub>10</sub>を含む区分を濃縮し、粗酵素Q<sub>10</sub> 13.9g

-11-

を含む赤色油状物が得られる。

次に先に使用したと同じハイポーラスボリマーHP-20を充填したカラムをアセトンで洗浄し、アセトン洗液を除去した後、アセトン：メタノール(4:6)の混合溶剤で逆洗し、静置する。次に前記赤色油状物を同溶媒20mLに乳化させて充填カラム中を流動させる。同溶媒で展開分離したのち粗酵素Q<sub>10</sub>を含む区分を濃縮すると粗酵素Q<sub>10</sub> 13.3g(純度97%)が得られる。さらにアセトンで再結晶し粗酵素Q<sub>10</sub> 11.9g(純度98.9%, m.p. 45°C)を得た。

#### 実験例 3

Pseudomonas 細菌 [Pseudomonas denitrificans NRRL B-1665 (Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604)]を培養し、遠心分離により細菌して得た遊離体ペーストを水酸化ナトリウムおよびビロガロールの存在下に、ヘキサン：メタノール混合液で加熱抽出する。次にヘキサン層を5%ハイドロカルブアイトソーダ水で洗浄し、さらに水洗して

-12-

(純度96%)を得る。

さらにアセトンで再結晶して粗酵素Q<sub>10</sub> 11.1g(純度98.6%, m.p. 49°C)を得た。

#### 実験例 2

ハイポーラスボリマーHP-20(40メッシュ、三堺化成工業株式会社製)200mLを45mLのカラムに充填しアセトン：メタノール(2:8)混合液で満たした。次にソラネソールと2,5-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンハイドロキノンとを炭化亜鉛触媒の存在下に結合させて得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレンハイドロキノン(還元型補酵素Q<sub>9</sub>)を含む油脂50g(純度46%)を商記混合液50mLに添加して提携乳濁させてから充填カラム中を流動させる。次いで同一混合液で洗出させる。次に2,5-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレンハイドロキノンを含む区分を減圧濃縮して得た処理物をイソプロピルエーテル400mLに溶解させ二段化鉄36gを添加し4時間搅拌する。酸化鉄を浮別したのち減圧濃縮すると

-13-

芒硝で脱水後減圧濃縮する。次いで被溶物のアセトン可溶部を取り、アセトンを留去して得た2,5-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンハイドロキノン(還元型補酵素Q<sub>9</sub>)を含む油状物30g(純度55%)を以下実験例1と同様に処理し補酵素Q<sub>10</sub> 13.4g(純度99.7%, m.p. 49°C)を得た。

#### 実験例 4

ハイポーラスボリマーHP-40(比表面積704.7m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.687m<sup>3</sup>/g、40メッシュ、三堺化成工業株式会社製)200mLをガラス製円柱(φ45mm×300mm)に充填し、アセトン：メタノール(3:7)混合液にて逆洗し、静置した。次に元液カラム上にインデカブレンールと2,5-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノン-4-セノアセテートとを三堺化ホウ素・ニーテル錠体触媒により結合することによって製造した2,5-ジメトキシ-5-メチル-6-デコブレンハイドロキノン-4-セノアセテート(還元型補酵素Q<sub>10</sub>のエステル)を合

-14-

タ(純度99.9% n.p. 42°C)を得た。

粗油質209(純度38%)を前記混合液20  
mlで搅拌乳化させてから仕込む。次いで同一混  
合液で洗出させる。洗出液は約100mlづつ区分  
し、それぞれの区分液の種級小量についてシリ  
カゲル薄層クロマトグラフィーを行つて2,3-  
ジメトキシ-5-メチル-6-デカブチニルヘ  
イドロキノン-4-キノアセテートを含む区分  
を検査させ、溶媒を減圧蒸餾によつて除去する。  
得られた油状物209をイソプロピルエーテル  
150mlに溶解し、これに10%過酸カリを含む  
メタノール10mlを加える0分間放置袋、水30  
mlを加え、室温で攪拌下に30分間空気を導入  
して酸化する。次にイソプロピルエーテル層を  
水洗し、培養を減圧留去して得られた粗酵素Q<sub>10</sub>  
含有物を再びハイポーラスポリマー HP-20 を  
200ml充満したカラムで実験例1と同様に流出  
後稀釈液Q<sub>10</sub>を含む区分を検査させ、溶媒を  
減圧留去すると粗酵素Q<sub>10</sub> 49g(純度97%)  
を得る。

さらにアセトンで再結晶して精製品として精製品 Q<sub>10</sub> 5.8

製許出願人 日清製粉株式会社

昭 59 10.11 鮎

特許法第17条の2の規定による補正の届出

昭和 52 特許許願第 45176 号(特開昭  
53-133687 9 昭和 53 年 11 月 21 日  
発行 公開特許公報 53-1337 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 (1)

1 ハイ C 17.	識別記号	所内整理番号
C12P 7/66		6760-4B

手続補正書(直表)

昭和59年3月16日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1 事件の表示

昭和 52 年特許願第 45176 号

2.発明の名称

補酵素の製造法

(本日付名称変更)

3.補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 103

住所 東京都中央区日本橋小舟町 19 號 12 号

名称 日研製粉株式会社

代表者 父 佐学

(本日付印鑑変更)

4.補正の対象

明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」  
および「発明の詳細な説明」の補

5.補正の内容

- 1) 本願明細書を別紙訂正明細書のとおり全文  
補正する。

訂正明細書

1.発明の名称 補酵素の製造法

2.特許請求の範囲

- 1) 原元型補酵素を多孔性合成樹脂で処理し、  
次いで処理した原元型補酵素を液化した後、  
さらに多孔性合成樹脂で処理することを特徴  
とする補酵素の製造法。
- 2) 多孔性合成樹脂が非活性多孔性合成樹脂で  
ある場合活性溶媒を使用してなる前記特許請  
求の方法。
- 3) 多孔性合成樹脂が活性多孔性合成樹脂であ  
る場合非活性溶媒を使用してなる前記特許請  
求の方法。

3.発明の詳細な説明

本発明は原元型補酵素を多孔性合成樹脂で  
処理し、次いで処理した原元型補酵素を液化  
してから活性多孔性合成樹脂で処理することを  
特徴とする補酵素の製造法に関する。

補酵素は生体内では電子伝導系に拘りし、  
各種疾患に対して効れた薬理効果を示す物質で